

乌蕨孢子萌发研究

任冰如，夏冰，李维林，吴菊兰，赵友谊

(江苏省中国科学院植物研究所南京中山植物园江苏省药用植物研究开发中心，江苏 南京 210014)

摘要：用随机区组试验和方差分析方法，研究了培养温度、贮藏温度、GA 处理和光照强度对乌蕨 (*Sphenomeris chinensis*) 孢子萌发的影响。与室温 (20~25) 相比，培养温度在 28 时，孢子最大萌发率相近而萌发速率明显较高。贮藏温度 (A) 极显著 ($P < 0.01$) 影响孢子萌发率，-20 贮藏降低萌发率；GA (B) 对孢子萌发率无显著影响。光照强度 (C) 极显著 ($P < 0.01$) 影响孢子萌发率，充足光照和弱光照无显著差异，黑暗处理降低萌发率。 $A \times B$ ， $A \times C$ ， $B \times C$ 及 $A \times B \times C$ 交互效应不显著。

关键词：乌蕨；孢子；萌发率

中图分类号：Q 945

文献标识码：A

文章编号：0253-2700 (2008) 06- 713- 05

Investigation on Spore Germination of *Sphenomeris chinensis* (Lindsaeaceae)

REN Bing-Ru, XIA Bing, LI Wei-Lin, WU Ju-Lan, ZHAO You-Yi

(Jiangsu Center for Research & Development of Medicinal plants, Jiangsu Institute of Botany, Chinese Academic of Science Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen, Nanjing 210014, China)

Abstract: Effects of culture temperature, storage temperature, GA treatment and illumination intensity on spore germination of *Sphenomeris chinensis* were studied using randomized blocks experiments and analysis of variance. Compared with room temperature (20-25), the germination velocity was higher at the culture temperature of 28 , although their maximal germination percentage was the same. Storage temperature (A) significantly ($P < 0.01$) affected spore germination, and germination of spores was reduced when stored at -20 . GA (B) did not affect germination. Illumination intensity (C) significantly ($P < 0.01$) affected germination. There were no significant difference between full and weak illumination, but the dark reduced germination percentage. $A \times B$, $A \times C$, $B \times C$ and $A \times B \times C$ had no significant interaction effect.

Key words: *Sphenomeris chinensis*; Spore; Germination percentage

乌蕨 [*Sphenomeris chinensis* (L.) Maxon (*Stenoloma chusanum* (L.) Ching)] 为鳞始蕨科 (Lindsaeaceae) 乌蕨属植物 (秦仁昌, 1959), 主要分布在长江以南地区。化学成分研究表明, 乌蕨含有黄酮类化合物、酚性酸等生物活性物质 (任冰如等, 2007), 在民间乌蕨素有“万能解毒药”之称 (江苏新医学院, 1977)。乌蕨叶片多分裂, 裂片精细可爱, 具有观赏价值。

近年来, 对乌蕨的过量采集和生境的破坏导致一些地区乌蕨野生资源匮乏, 为了保护及可持

续性地利用乌蕨资源, 必须建立人工栽培繁殖体系。以孢子繁殖既可保护现有资源不受破坏, 又能扩大种群数量, 因此研究乌蕨的孢子繁殖具有重要意义。本文探讨了外界条件对乌蕨孢子萌发的影响, 为乌蕨的人工栽培提供一些基础数据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

2006 年 9 月初于福建省明溪县采集顶端有成熟孢子囊的乌蕨孢子叶, 凭证标本号为 542997 (条形码 NAS00145741),

存放于江苏省中国科学院植物研究所标本馆。在室内通风处晾干，收集孢子，包好后在变色硅胶中密封保存，8个月后进行孢子萌发试验。

1.2 仪器设备和试剂

解剖镜：目镜×物镜为15×4。SHz-D循环水式真空泵。GZX-250BS-光照培养箱。TES-1332A数位式照度计。赤霉素（GA）配制成3 000 mg L的母液，即配即用。

1.3 实验方法

1.3.1 配制孢子悬浊液：称取干燥的孢子粉末5 mg，加5 ml冷却的沸水，放置1 h，用真空泵抽气1 h，使孢子快速吸足水分。静止10 min，移去上层水液及漂浮物，用300 mg L GA浸泡15 min，移去GA溶液，用水定容至20 ml。不用GA处理的材料直接用水定容到20 ml待用。

1.3.2 播孢：取直径为9 cm的培养皿，垫入2层新华滤纸，用巴氏滴管吸取约1 ml的孢子悬浊液，均匀滴加到培养皿中，保持滤纸湿润，用于各培养试验。

1.3.3 培养温度试验：除培养温度外，其他条件均一致。培养温度分别为20~25（室温）和28，取室温贮藏的孢子，在充足光照（10 000 lx，随昼夜变化）下培养。

1.3.4 随机区组试验设计：设A、B、C三个因素，A为孢子贮藏温度，A1：10~25（室温），A2：-20；B为GA处理，浓度为B1：0 mg L，B2：300 mg L；C为光照强度，C1：10 000 lx（充足），C2：500 lx（弱光），C3：0 lx（黑暗）；设定培养温度28，光照强度模拟昼夜变化。

1.3.5 数据采集：在每个培养皿上随机选定5个点作标记，定期观察孢子萌发情况。在每处计数1个视野内的萌发孢子数和未萌发孢子数，孢子萌发率（%）= 萌发孢子数 /（萌发孢子数 + 未萌发孢子数）× 100%。

1.3.6 数据分析：利用SPSS10.0软件对所采集的数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 培养温度对孢子萌发的影响

乌蕨孢子在不同温度培养下，最大萌发率相近，达到55%左右，但孢子萌发速率在28 培养的明显快于室温培养的，且孢子在播后第6 d即开始萌发，第12 d达最大值，萌发速率在第6~12 d最快；室温培养的孢子播后第11 d开始萌发，第19 d萌发率达最大值，萌发速率在播后第11~19 d最快（图1）。

2.2 贮藏温度、赤霉素、光照强度对孢子萌发的影响

2.2.1 贮藏温度对孢子萌发率的影响 由于乌蕨孢子在28 培养萌发速率快，因此采用在28 下，对贮藏温度、赤霉素、光照强度三因素进行随机区组试验，了解各因素对孢子萌发的影响及各因素间的相互作用。

由图2可知，乌蕨孢子分别在10~25 和-20 中保存8个月后，都在播后第6 d开始萌发，并在播后12 d达到最大值，但-20 贮藏的孢子在播后第8 d显示萌发率低于室温贮藏的，孢子最大萌发率为33.09%，室温贮藏的最大萌发率为44.35%，可见-20 不利于乌蕨孢子贮藏。

2.2.2 GA对孢子萌发率的影响 随机区组试验结果表明，在整个培养过程中，GA为0和300 mg L的处理，孢子萌发率的差异不明显（图3）。孢子在播后第6 d开始萌发，第12 d达最大值，萌发率最大值分别为39.37%和38.07%，说明

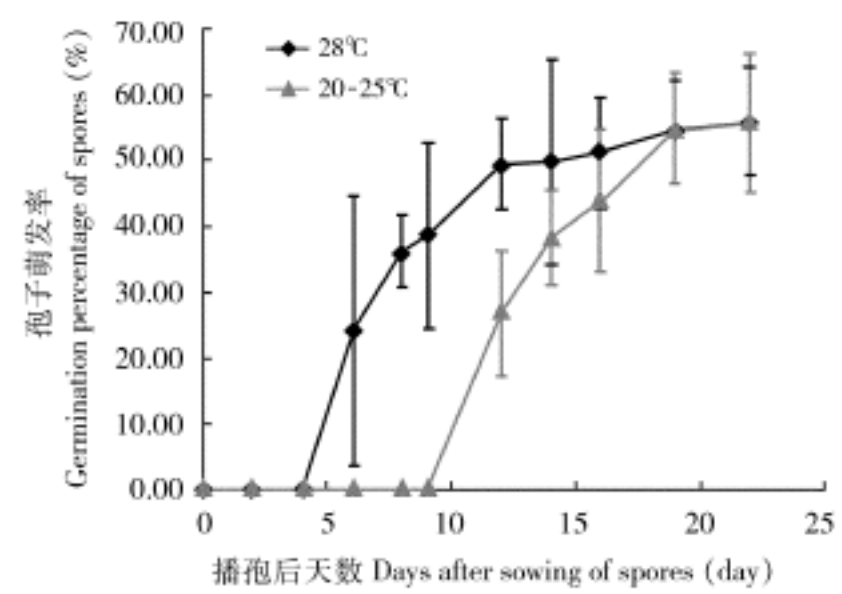


图1 不同培养温度下乌蕨孢子萌发率的变化
Fig. 1 Changes of germination percentage about spores of *Sphenomeris chinensis* under different culture temperature

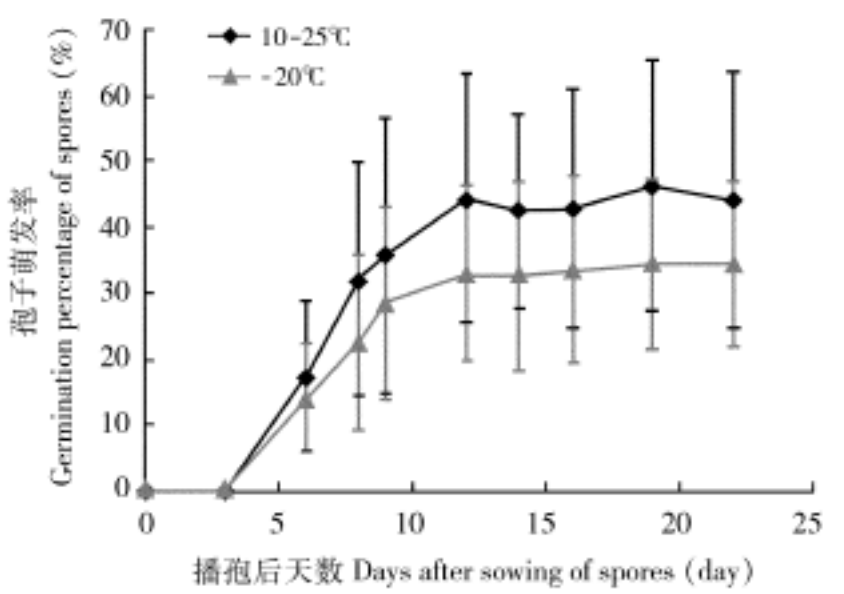


图2 贮藏温度对乌蕨孢子萌发的影响
Fig. 2 Effects of storage temperature on the spores germination of *Sphenomeris chinensis*

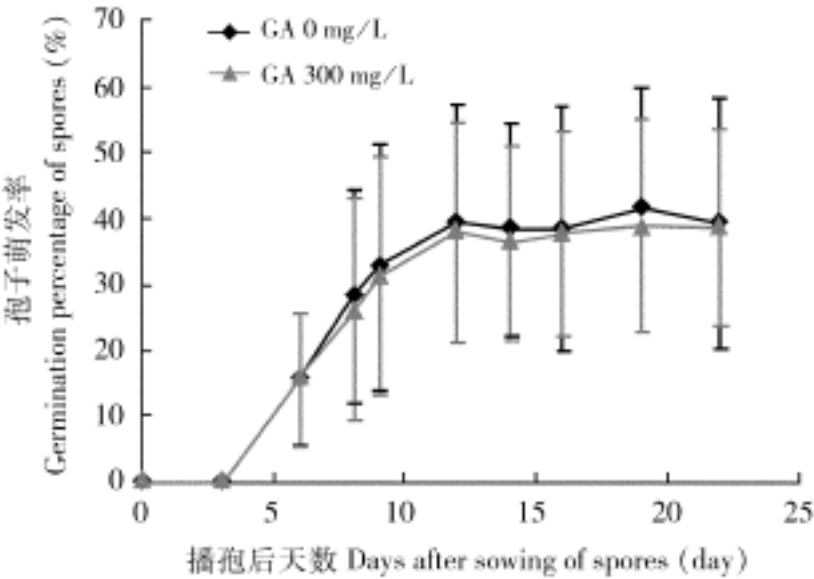


图 3 GA 对乌蕨孢子萌发率的影响
Fig .3 Effects of GA on the spores germination
of *Sphenomeris chinensis*

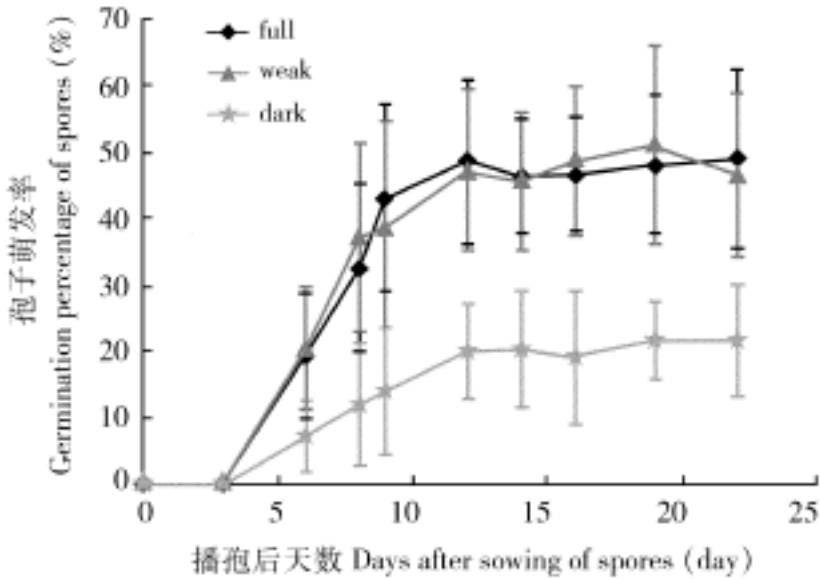


图 4 光照强度对乌蕨孢子萌发率的影响
Fig .4 Effects of illumination on the spores
germination of *Sphenomeris chinensis*

300 mg L GA 处理 15 min 对孢子萌发几乎无效。

2.2.3 光照强度对孢子萌发率的影响 如图 4 所示，3 个光照水平的处理其孢子开始萌发及达到最大萌发率的时间是一致的，充足光照和弱光照条件下全程的萌发率均无明显差异，最大萌发率分别为 48.75% 和 47.42%，但黑暗使孢子萌发率降低，其最大萌发率仅 19.99% 左右。

2.2.4 三因素对萌发率影响的方差分析 根据以上分析结果，所有处理的孢子萌发率都在播后第 12 d 达最大值，故采用播后第 12 d 的数据，利用 SPSS 软件进行方差分析，进一步探讨三因素对乌蕨孢子萌发率的影响。由表 1 可知，按 0.01 检验标准，A 处理和 C 处理均有极显著效应，B 处理无显著效应。 $Eta^2 C > Eta^2 A$ ，认为 C 处理对总变异的贡献大于 A 处理，观察效能 $A = 0.998$ ，C

$= 1.000$ ，说明两因素的检验效能均很大，无须增加样本含量。以上结果表明，乌蕨孢子的贮藏温度、孢子培养过程中的光照强度极显著地影响孢子萌发率，光照强度对萌发率的影响更大，而所设置的 GA 处理方法则对孢子萌发率无显著影响。表 1 显示 $A \times B$ ， $A \times C$ ， $B \times C$ 以及 $A \times B \times C$ 的 P 值均大于 0.05，说明三因素的交互效应不显著。

结合表 2 各处理的均数和差异显著性分析，可见 A1 处理极显著地高于 A2 处理，说明室温贮藏的孢子萌发率极显著地高于 -20 贮藏的孢子，-20 对于孢子贮藏不利。B1 和 B2 处理之间差异不显著，说明浓度为 300 mg L 的 GA 处理 15 min 对乌蕨孢子萌发无效。C1 和 C2 处理之间无显著性差异，但 C3 处理极显著地低于 C1 和 C2，说明黑暗条件严重影响乌蕨孢子萌发。

表 1 贮藏温度 (A)、GA (B)、光照强度 (C) 对乌蕨孢子萌发率影响的方差分析 (播后 12 d)

Table 1 Analysis of variance about the effect of storage temperature (A), GA (B) and illumination (C) on the spore germination percentage of *Sphenomeris chinensis* after sowing of 12 days

变异来源 Source	平方和 Type III Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F	P	Eta 平方 Eta Squared	观察效能 Observed Power
截距 Intercept	89944.24	1	89944.24	1178.00	.000	.961	1.000
处理间	13597.15	11	1236.10	16.19	.000	.788	1.000
A 处理	1902.60	1	1902.60	24.92	.000	.342	.998
B 处理	25.21	1	25.21	.33	.568	.007	.087
C 处理	10540.26	2	5270.13	69.02	.000	.742	1.000
A × B	37.62	1	37.62	.49	.486	.010	.106
A × C	433.08	2	216.54	2.84	.069	.106	.531
B × C	294.69	2	147.35	1.93	.156	.074	.381
A × B × C	363.70	2	181.85	2.38	.103	.090	.458
Error	3664.96	48	76.35				
Total	107206.35	60					
Corrected Total	17262.11	59					

表 2 各处理和各水平的平均数及差异显著性分析
Table 2 Analysis of means and significance for the treatments

处理 Treatment	平均数 Mean	5% 差异显著性 5 % significant	1% 差异显著性 1 % significant
A1	44.35	a	A
A2	33.09	b	B
B1	39.37	a	A
B2	38.07	a	A
C1	48.75	a	A
C2	47.42	a	A
C3	19.99	b	B
A1 × B2	44.49	a	A
A1 × B1	44.21	a	A
A2 × B1	34.53	b	B
A2 × B2	31.65	b	B
A1 × C2	56.25	a	A
A1 × C1	54.55	a	A
A2 × C1	42.95	b	B
A2 × C2	38.58	b	B
A1 × C3	22.25	c	C
A2 × C3	17.73	c	C
B1 × C1	52.22	a	A
B1 × C2	47.84	a	A
B2 × C2	46.99	a	A
B2 × C1	45.28	a	A
B2 × C3	21.94	b	B
B1 × C3	18.04	b	B
A1 × B1 × C1	60.50	a	A
A1 × B2 × C2	59.27	a	AB
A2 × B2 × C2	53.23	ab	ABC
A1 × B2 × C1	48.59	ab	ABCD
A2 × B1 × C1	43.93	bc	BCD
A2 × B1 × C2	42.44	bc	CD
A2 × B2 × C1	41.97	bc	CD
A2 × B2 × C2	34.72	cd	DE
A1 × B2 × C3	25.62	de	EF
A1 × B1 × C3	18.88	e	F
A2 × B2 × C3	18.25	e	F
A2 × B1 × C3	17.21	e	F

在处理的所有组合中，A1 × B1 × C1 孢子萌发率最高，即室温条件下贮藏的孢子，无 GA 处理，充足光照是最优选的培养条件。A1 × B1 × C3，A2 × B2 × C3，A2 × B1 × C3 三种组合孢子萌发率最低，前述分析表明，A × B × C 三因素的交互效应不显著，导致三种组合孢子萌发率降低的主要原因还在于黑暗条件。

3 讨论

乌蕨孢子萌发试验表明，虽然室温（20 ~ 25 ℃）和 28 ℃ 两种培养温度下孢子的最大萌发率相同，但 28 ℃ 条件下孢子萌发速率较快，与 Rana (1999) 的较高温度下（18.4 ~ 25.2 ℃）一

些蕨类孢子的萌发时间较短的结论相一致。但 Haupt (1992) 的研究结果表明培养温度若由 22 ℃ 上升到 32 ℃，由光敏色素介导的孢子萌发则会受到抑制，可见不同物种对温度的反应存在差异。

前人的研究表明蕨类的孢子萌发都需要光照 (牛俊义等, 2002; 曾汉元和丁炳扬, 2004)，本试验中光照条件下乌蕨孢子的萌发率极显著地高于黑暗处理，而充足光照和弱光照下培养的孢子其萌发率差异不显著，说明乌蕨孢子萌发具有需光性。光质及其强度对孢子萌发具有重要影响，红光促进孢子萌发，蓝光和远红光则无效甚至有延迟或抑制作用，认为光敏素是一些蕨类孢子萌发的光受体 (Sugat and Furuya, 1967)，但也有些蕨类的孢子萌发可能与光敏素无关 (Towill and Ikuma, 1973)，近年从铁线蕨 (*Adiantum capillus-veneris*) 中分离到两种蓝光受体基因，即隐花色素基因 4 和 5 (CRY4 和 CRY5)，其基因表达受光调节，并受光敏色素控制，这些基因可能是光的受体，在抑制孢子萌发时受到蓝光调节 (Imaizumi, 2000)。

GA₃ 对蕨菜 (*Pteridium aquilinum*) 的孢子萌发及生长发育具有明显促进作用 (牛俊义等, 2002)，但本文 GA 处理既没有使乌蕨孢子提前萌发，也没有使萌发率提高。通常认为 GA 具有解除休眠的作用 (方志荣等, 2007)，以往的试验结果显示，当年采集的乌蕨孢子立即播于培养基质，10 d 后肉眼就可观察到孢子已经萌发，说明乌蕨孢子可能不存在休眠期，这可以解释 GA 处理对乌蕨孢子萌发无促进作用的现象。研究发现，GA 对蕨类孢子在暗处萌发有一定促进作用 (Nester and Coolbaugh, 1986)。本文孢子萌发的随机区组试验在光照和黑暗条件下进行，但黑暗处理在观察过程中也接受了一定光照，可能使 GA 对孢子在暗处萌发的促进作用难以体现，并导致 GA 处理与光照处理无显著的互作效应。在蕨菜的孢子萌发试验中也显示 GA₃ 处理与光照无显著的互作效应 (牛俊义等, 2002)。

蚌壳蕨属 (*Dicksonia sellowiana*) 的孢子储存于液氮中能促进休眠孢子萌发 (Rogge 等, 2000)；而用湿法保存的 2 种金毛狗蕨和 3 种狗脊蕨的孢子，在 20 ℃ 时会萌发，在 -20 ℃ 储存 1

月，所有种的孢子全部或大部分死亡 (Quintanilla 等, 2002)。说明低温储存对休眠孢子的萌发有促进作用，而对非休眠的孢子则有极大伤害。本试验在 -20℃ 贮藏的乌蕨孢子其萌发率有所下降，推测萌发率下降的原因是由于孢子处于非休眠状态，-20℃ 低温使孢子受到冻害，但由于贮藏的孢子处于干燥状态，孢子含水量低，代谢速度慢，-20℃ 低温保存 8 个月不足以将全部孢子杀死。本试验结果提示乌蕨孢子不宜在低于 -20℃ 的条件储存。

〔参 考 文 献〕

- 江苏新医学院编, 1977. 中药大辞典, 上册 [M]. 上海: 上海人民出版社, 157—158
- 秦仁昌, 1959. 中国植物志 2 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 275—279
- Fang ZR (方志荣), Su ZX (苏智先), Hu JY (胡进耀), 2007. Regulation of abscisic acid, gibberellins and ethylene on seed dormancy [J]. *J China West Normal Univ (Natural Sciences)* (西华师范大学学报 (自然科学版)), 28 (2): 127—132
- Haupt W, 1992. Phytochrome-mediated fern-spore germination-A temperature-sensitive phase in the transduction chain after the action of Pfr [J]. *J Plant Physiol*, 140 (5): 575—581
- Imaizumi T, Kanegae T, Wada M, 2000. Cryptochrome nucleocytoplasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris* [J]. *Plant Cell*, 12 (1): 81—96
- Nester JE, Coolbaugh RC, 1986. Factors influencing spore germination and early gametophyte development in *Anemia mexicana* and *Anemia phyllitidis* [J]. *Plant Physiol*, 82 (1): 230—235
- Niu JY (牛俊义), Li S (李胜), Xu ZM (徐作平) *et al.*, 2002. Effect of illumination and exogenous substance on spore germination and seedling survival of *Pteridium aquilinum* [J]. *Acta Horticulturae Sin* (园艺学报), 29 (6): 584—586
- Quintanilla LG, Amigo J, Pangua E *et al.*, 2002. Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species [J]. *Ann Bot*, 90 (4): 461—467
- Ranal MA, 1999. Effects of temperature on spore germination in some fern species from semideciduous mesophytic forest [J]. *Amer Fern J*, 89 (2): 149—158
- Ren BR (任冰如), Xia B (夏冰), Li WL (李维林) *et al.*, 2007. Chemical constituents of *Stenoloma chusanum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 38 (1): 20—23
- Rogge GD, Viana AM, Randi AM, 2000. Cryopreservation of spores of *Dicksonia sellowiana*: an endangered tree fern indigenous to South and Central America [J]. *Cryo Letters*, 21 (4): 223—230
- Sugat M, Furuya M, 1967. Photomorphogenesis in *Pteris vittata*. . . . Phytochrome-mediated spore germination and blue light interaction [J]. *Plant Cell Physiol*, 8: 737—748
- Towill LR, Ikuma H, 1973. Photocontrol of the germination of *Onoclea* spores: . . . Action Spectrum [J]. *Plant Physiol*, 51 (5): 973—978
- Zeng HY (曾汉元), Ding BY (丁炳扬), 2004. Observations on the spore germination and prothallium development of ferns [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 22 (4): 368—371